



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 31 380 A 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
C 07 K 14/245

⑲ Aktenzeichen: 199 31 380.6
⑳ Anmeldetag: 7. 7. 1999
㉑ Offenlegungstag: 11. 1. 2001

DE 199 31 380 A 1

⑦① Anmelder:
F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH

⑦④ Vertreter:
Weickmann & Weickmann, 81679 München

⑦② Erfinder:
Burckhardt, Jean, Dr., Magden, CH; Haass, Michael,
Dr., 79395 Neuenburg, DE; Lehmann, Hans-Peter,
Dr., 82377 Penzberg, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verfahren zur rekombinanten Herstellung von Ribonukleoproteinen
⑤⑦ Es wird ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung
von Ribonukleoproteinen in prokaryontischen Zellen be-
schrieben.

DE 199 31 380 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Ribonukleoproteins in prokaryontischen Zellen.

5 Im Serum von Patienten mit der Autoimmunerkrankung SLE (systemischer Lupus Erythematosus) treten häufig Antikörper auf, die gegen Ribonukleoproteine, wie etwa das SSA60-Autoantigen, gerichtet sind. Das SSA60-Antigen ist ein RNA-bindendes Molekül, das im Cytoplasma und im Nukleus verschiedener Zelltypen vorkommt. Das SSA60-Antigen ist häufig an eine HY-RNA gebunden, wie z. B. HY1, HY3, HY4 oder HY5, die jeweils etwa 100 Basen lang sind und eine sehr ähnliche Struktur aufweisen. HY-RNA-Moleküle, die in vielen eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden konnten, kommen in Prokaryonten nicht vor.

10 Eine Analyse der Antikörperantwort auf Ribonukleoproteine ist von großem Interesse, um eine Diagnose von Autoimmunerkrankungen, insbesondere SLE, aufstellen zu können, da die Gegenwart von gegen Autoantigene gerichteten Antikörpern eine bestehende Autoimmunerkrankung anzeigt und/oder eine Prognose für ein mögliches zukünftiges Auftreten einer Autoimmunerkrankung erlaubt.

15 Das SSA60-Antigen wird häufig auch als SSA/Ro bezeichnet. Es handelt sich um ein Protein mit einer Größe von etwa 60 kD. Davon ist sowohl hinsichtlich der Sequenz als auch der Funktion das SSA52-Antigen zu unterscheiden, wobei jedoch unter bestimmten Bedingungen in vivo eine Assoziation des SSA52-Proteins mit dem SSA60-Protein auftreten kann.

20 Die Sequenz der cDNA von SSA60 wurde von Deutscher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 85 (1988), 9479-9483 veröffentlicht. HY-RNAs wurden von Hendrick et al., J. Mol. Biol. 1 (1981), 1138-1149 sowie von Wolin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 1996-2000 beschrieben.

25 Bisher wurden für diagnostische Verfahren, beispielsweise unter Verwendung eines EIA (Enzymimmunoassay)-Verfahrens natives gereinigtes SSA60-Antigen (z. B. Rindermilzantigen von Immunovision) sowie reine rekombinante SSA60-Antigene aus Baculovirus oder E.coli ohne RNA eingesetzt. Dabei ist die dreidimensionale Struktur (Faltung) des Antigens von essentieller Bedeutung für die immunologische Erkennung aller relevanten Patientenserum. Die Konformation und Reproduzierbarkeit des SSA60-Antigens variiert je nach Herstellungsverfahren wie folgt:

a) Nativ gereinigtes Protein ist der "Goldstandard" bezüglich Sensitivität für SSA60 Autoantikörper (z. B. Immunovision). Dieses Material repräsentiert die physiologische (native) Konformation. Bei Einsatz dieses Antigens können aber auch falsch-positive Resultate auftreten, z. B. durch die Erkennung natürlicher Autoantikörper, die nicht krankheitsrelevant sind. Desweiteren hängt die Reproduzierbarkeit der Aufreinigung von der Selektion der Immunnaffinitätsmatrix ab.

30 b) Rekombinantes Protein aus E.coli liegt im Wesentlichen in denaturierter, also linearer Konformation vor, da in E.coli keine posttranslationale Modifikation von Proteinen erfolgt. Dadurch wird ein bestimmter Anteil von Patientenserum nicht erfaßt. Allerdings ist die Detektion krankheitsrelevanter Autoantikörper spezifischer im Vergleich zu nativem Antigen. Mit dieser Methode können eine gute Reproduzierbarkeit und Ausbeute erhalten werden. Bei dieser Testführung wird rekombinantes freies SSA60-Antigen aus E.coli eingesetzt, das nicht an RNA assoziiert ist. Dazu wird z. B. die cDNA von SSA60 mit Primern, die gemäß der SSA60-Sequenz von Deutscher et al., supra, hergestellt werden, aus einer cDNA-Bank gefischt, kloniert und sequenziert. C. H. A. Veldhofen et al., J. Immunol. Methods 151 (1992) 177-189 beschreibt die Entwicklung eines quantitativen Assays für die Detektion von Antikörpern gegen SSA60 (RO/SSA) unter Verwendung von rekombinanten freien Proteinen, die in E.coli kloniert und exprimiert wurden. Es zeigte sich aber, daß einige Seren, die mit anderen Tests als SSA60 positive Seren identifiziert werden können, mit solchen Antigen-Präparationen ohne RNA nicht detektiert werden können, da die Antigene in einer denaturierten Form vorliegen (G. Boire et al., Arthritis and Rheumatism, Vol. 34 No. 6 (1991), 722-730; B. William St. Clair et al., Arthritis and Rheumatism, Vol. 37 No. 9 (1994), 1373-1379).

45 c) Rekombinantes Protein aus Baculovirus kann als "pseudo-natives" SSA60-Antigen betrachtet werden, da in diesem eukaryontischen Expressionssystem die Faltung bei der Proteinbiosynthese (zumindest die dafür notwendige Disulfidverbrückung) korrekt erfolgt. Die immunologische Reaktivität ist mit derjenigen des nativ isolierten SSA60-Antigens vergleichbar. Das Problem bei der Herstellung ist die schlechte Ausbeute und die kostenintensive Zellkultur. Es werden zwar gute Testergebnisse erzielt, die Gewinnung von großen Mengen an Autoantigenen für kommerzielle Diagnoseverfahren ist bei dieser Verfahrensführung jedoch aufwendig und mit den bei der Handhabung einer Zellkultur auftretenden Problemen verbunden.

50 Es war deshalb eine Aufgabe der Erfindung ein einfach durchzuführendes Verfahren bereitzustellen, mit dem Ribonukleoproteine in einer Form erhalten werden, die eine hohe Selektivität und Testsicherheit bei diagnostischen Verfahren liefert.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Ribonukleoproteins, welches die Schritte umfaßt:

- 60 (a) Bereitstellen einer prokaryontischen Wirtszelle, die (i) mindestens eine für eine Ribonukleinsäurekomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA und (ii) mindestens eine für eine Proteinkomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA enthält,
 (b) Exprimieren der DNAs (i) und (ii) unter Bedingungen, bei denen ein Ribonukleoprotein gebildet wird und
 65 (c) Gewinnen des Ribonukleoproteins.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß in prokaryontischen Zellen Ribonukleoproteine durch parallele Expression der Ribonukleinsäure- und der Proteinkomponente rekombinant in funktioneller, z. B. immunologisch aktiver Form, hergestellt werden können. Auf diese Weise ist eine einfache und kostengünstige Herstellung von Ribonukleoproteinen

im großen Maßstab möglich. Bevorzugt werden die Protein- und die Ribonukleinsäurekomponente in einer assoziierten Form erhalten. Die Ribonukleoproteine können in ihrer nativen und somit zumeist löslichen Form hergestellt werden. Es hat sich gezeigt, daß Seren von Patienten mit SLE, die in Tests mit rekombinant hergestellten Proteinen ohne Ribonukleinsäurekomponente negativ sind, mit den erfindungsgemäß hergestellten Ribonukleoproteinen nachgewiesen werden konnten.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um ein gut reproduzierbares und kostengünstiges Verfahren, mit dem ein SSA60-Antigen mit guter immunologischer Reaktivität zur Detektion krankheitsrelevanter SSA60-Autoantikörper hergestellt werden kann.

Die Ribonukleoproteine können aus den prokaryontischen Zellen oder/und aus dem zur Kultivierung der Zellen verwendeten Medium gewonnen werden. Es werden bevorzugt gram-negative Zellen und insbesondere E.coli Zellen verwendet.

Die für die Ribonukleinsäurekomponente codierende DNA und die für die Proteinkomponente codierende DNA können in die prokaryontische Wirtszelle auf einem DNA-Konstrukt eingebracht werden. Es ist aber auch möglich, die für die einzelnen Komponenten codierenden DNAs auf getrennten DNA-Konstrukten einzubringen. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können beliebige Ribonukleoproteine hergestellt werden, wobei geeigneterweise die Proteinkomponente(n) und die entsprechende(n) zugehörige(n) Nukleinsäurekomponente(n) in einer Wirtszelle exprimiert werden.

Bevorzugt stellt man ein Eukaryonten- insbesondere ein Säuger- und besonders bevorzugt ein humanes Ribonukleoprotein oder ein Derivat davon her. Ein Derivat ist gegenüber der nativen Form in der Sequenz der Ribonukleinsäure und/oder der Sequenz des Proteins modifiziert, beispielsweise durch Substitution, Deletion, Insertion oder/und Addition von einzelnen oder mehreren Aminosäuren bzw. Nucleobasen, wobei jedoch die Fähigkeit der Komponenten zur Assoziierung zum Ribonukleoprotein erhalten bleibt.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird ein SSA60-Ribonukleoprotein exprimiert. Das humane SSA60-Antigen ist ein Protein mit 525 (Form a) bzw. 538 (Form b) Aminosäuren (vgl. Deutscher et al., supra). Ein unterschiedliches Splicing des gleichen primären Transkripts führt zu den zwei verschiedenen Formen des SSA60-Proteins. Die zwei Proteine unterscheiden sich nur von der Aminosäure 515 an, wobei die Aminosäuren 1 bis 514 konstant sind. Bevorzugt wird mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ein SSA60-Protein exprimiert, das den konstanten Bereich der Aminosäuren 1 bis 514 umfaßt, sowie SSA60-Proteinderivate, die gegenüber der nativen Form in der Sequenz modifiziert sind, wobei jedoch die Antigen-Epitopeigenschaften beibehalten werden.

Bei der Ribonukleinsäurekomponente handelt es sich bevorzugt um eine HY-RNA, insbesondere um HY1, HY3, HY4 oder/und HY5, am meisten bevorzugt um HY3. Die HY-RNA-Moleküle sind hochkonservierte Moleküle mit einer sehr ähnlichen sekundären Struktur. Sie werden in vivo durch Polymerase III transkribiert und haben eine Größe zwischen 84 und 112 Nukleotiden.

Cytoplasmische RNA, insbesondere menschliche RNA, bevorzugt hY-RNA, liefert einen wichtigen Beitrag zur Ausprägung der nativen Konformation des SSA60-Antigens. Physiologisch liegt das SSA60-Antigen als ein mit SSB, SSA52 und hY-RNA vergesellschaftetes Ribo-Nukleo-Partikel (RNP) vor.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft ein Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen Abschnitt, der eine für eine Proteinkomponente codierende DNA enthält und einen Abschnitt, der eine für eine Ribonukleinsäurekomponente codierende DNA enthält. Die codierenden Abschnitte befinden sich bevorzugt in operativer Verknüpfung mit einer Sequenz, die die Expression der Komponenten in prokaryontischen Zellen ermöglicht. Bevorzugt umfaßt das Konstrukt einen Abschnitt, der einen für ein SSA60-Protein oder ein Derivat davon codierenden Abschnitt umfaßt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Konstrukt einen für HY-RNA codierenden Abschnitt. Besonders bevorzugt ist ein Konstrukt, das einen für SSA60 und einen für HY3 codierenden Abschnitt enthält. Bei Expression eines solchen Konstrukts wird ein assoziiertes Ribonukleoprotein mit der gewünschten immunologisch reaktiven Konformation des Antigens gebildet. Die Assoziation kann dadurch unterstützt werden, daß eine gleichzeitige Induzierung der Expression von Ribonukleinsäurekomponente und Proteinkomponente erfolgt. Dies kann dadurch erreicht werden, daß sowohl das Gen für die Ribonukleinsäurekomponente als auch das Gen für die Proteinkomponente unter die Kontrolle von gleichen regulierbaren Expressionssystemen, z. B. von lac-Expressionssystemen, gestellt werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft eine rekombinante prokaryontische Zelle, die (i) mindestens eine für eine Ribonukleinsäurekomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA enthält und (ii) mindestens eine für eine Proteinkomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA enthält. Die codierenden Bereiche können dabei innerhalb der Zelle auf einem einzigen Konstrukt vorliegen oder aber auch getrennt auf mehreren Konstrukten. Die codierenden Bereiche können extrachromosomal, z. B. auf Plasmiden oder/und chromosomal angeordnet sein.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein rekombinantes Ribonukleoprotein, das durch das oben beschriebene Verfahren erhältlich ist. Durch die Coexpression von Protein und Ribonukleinsäure in prokaryontischen Zellen wird ein Ribonukleoprotein gebildet, welches nicht glykosyliert ist und sich dadurch von in eukaryontischen Wirtszellen gebildeten Ribonukleoproteinen unterscheidet. Bevorzugt umfaßt die Proteinkomponente des rekombinanten Ribonukleoproteins heterologe Hilfssequenzen, die die Expression verbessern oder/und die Aufreinigung erleichtern. Diese Hilfssequenzen können gegebenenfalls Protease-Spaltsequenzen enthalten, so daß sie nach Gewinnung des Produkts entfernt werden können. Ein Beispiel für eine Hilfssequenz ist ein mehrere His-Reste umfassender Sequenzabschnitt (His-Tag).

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein SSA60-Protein mit der in Fig. 1 gezeigten Sequenz SSA60M56. Das erfindungsgemäße SSA60-Protein weist am N-Terminus eine Hilfssequenz auf, die neben 6 His-Resten eine Spaltsequenz DDDK für das proteolytische Enzym Bovine Enterokinase enthält.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von rekombinanten Ribonukleoproteinen aus Prokaryonten für diagnostische Verfahren. Die Bildung von Ribonukleoproteinen in nativer, insbesondere in assoziierter Form ermöglicht die Bereitstellung von Antigenen, mit denen eine Verbesserung von diagnostischen Verfahren erzielt werden kann. Bevorzugt wird ein rekombinantes SSA60-Ribonukleoprotein oder ein Derivat davon, insbesondere in Verbindung mit HY3, für die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen, z. B. SLE oder Sjogren Syndrom Typ A, eingesetzt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung

eines Analyt-spezifischen Rezeptors, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß man als Rezeptor ein Ribonukleoprotein, wie es hierin beschrieben wird, einsetzt. Bei dem Analyten handelt es sich bevorzugt um einen Antikörper gegen ein Ribonukleoprotein, beispielsweise einen Autoantikörper, wie er bei Autoimmunkrankheiten auftritt. Eine geeignete Testvorgehensweise umfaßt die Schritte

5

- (a) Bereitstellen einer Festphase, die mit einem Ribonukleoprotein beschichtet ist,
- (b) Inkontaktbringen der beschichteten Festphase mit einer Probe und
- (c) Nachweis einer Bindung zwischen dem Analyten und der beschichteten Festphase.

10 Als Festphase finden insbesondere Beads Verwendung, es können jedoch auch andere Festphasen, z. B. Oberflächen von Reaktionsgefäßen oder Biochips eingesetzt werden. Die Festphase kann ausschließlich mit dem Ribonukleoprotein oder zusätzlich mit weiteren Molekülen, z. B. rekombinanten oder/und nativen Antigenen oder Antigengemischen, beschichtet sein. Die Ribonukleoproteine können direkt durch adsorptive oder kovalente Bindung auf der Festphase immobilisiert werden oder indirekt über ein spezifisches Bindepaar, insbesondere Biotin/Streptavidin, wobei zunächst die Festphase mit einem Partner des spezifischen Bindepaares beschichtet wird und das mit dem zweiten Partner des spezifischen Bindepaares gekoppelte Ribonukleoprotein dann auf die vorbeschichtete Festphase aufgebracht wird. Der Nachweis kann auf herkömmliche Weise, beispielsweise unter Verwendung eines markierten Antikörpers, insbesondere eines Maus-Anti-human-IgG-POD (POD = Peroxidase) durchgeführt werden. Als Markierungsgruppen finden insbesondere Elektrochemilumineszenzmarkierungen, Fluoreszenzmarkierungen, Enzymmarkierungen, Sol-Partikel, wie z. B. Latexpartikel oder Goldpartikel und radioaktive Markierungen Verwendung.

20

Die Erfindung wird durch die Figuren und die Beispiele weiter erläutert, wobei

Fig. 1 die Aminosäuresequenz der rekombinanten Antigene SSA60 M4-C6 (obere Sequenz) und SSA60 M56 (untere Sequenz) darstellt;

25

Fig. 2 einen Vergleich der von Wolin et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 1996-2000 veröffentlichten Sequenz von HY3 (obere Sequenz) und der im Klon HY3-SSA60 M56 (untere Sequenz) verwendeten Gensequenz. Die Punktmutation ist durch einen dicker gedruckten Buchstaben gekennzeichnet;

Fig. 3 die DNA- und Aminosäuresequenz von pQE30-HY3-SSA60 M56 #4 zeigt, wobei das HY3-Gen zwischen den zwei XhoI-Stellen (bp 232-419) angeordnet ist, während das SSA60 M56 stromab der EcoRI-Stelle (Translationsstart bei bp 533) zu finden ist. Charakteristische Restriktionsstellen sind angegeben. Die unterstrichenen Aminosäuren werden vom Vektor codiert, die anderen gehören zur humanen SSA60-Sequenz;

30

Fig. 4 zeigt ein Testformat mit beschichteten Beads, wobei die Beads neben den erfindungsgemäßen Ribonukleoproteinen weitere Erkennungsmoleküle tragen können, beispielsweise einen HEp2-Extrakt, SSA52, SSA60, SSB, Scl70, Jo1, CENP-B oder/und dsDNA. Die beschichteten Beads werden dann mit unverdünnter Probe, beispielsweise 25 µl, und einem Puffer, beispielsweise 250 µl, inkubiert, beispielsweise für 30 Minuten. Nach einem Waschschrift wird ein Nachweisreagenz, beispielsweise 250 µl Maus-Anti-Human-IgG-POD-Konjugat zugegeben und 15 Minuten inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift folgt der Nachweis mit TMB;

35

Fig. 5 zeigt ein Testformat mit Beads, die mit SSA60 beschichtet sind. Die beschichteten Beads werden mit 10 µl Serum als Probe und 250 µl Probepuffer für 15 min inkubiert. Nach einem Waschschrift wird 250 µl Maus-Anti-Human-IgG-POD-Konjugat zugegeben und 15 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgt die Auswertung mit TMB.

40

Beispiel 1

Herstellung eines rekombinanten HY3-SSA60-Antigens

45

Es wurde ein SSA60-M56 genanntes Antigen verwendet, welches ein modifiziertes rekombinantes SSA60-Protein mit Änderungen am N- und C-terminalen Ende ist, was die Möglichkeit eröffnet, ein rekombinantes Protein mit der Aminosäuresequenz des nativen SSA60-Proteins herzustellen, wobei keine Aminosäuren vom Vektor codiert werden, sowie ein rekombinantes SSA60-Antigen, welches nur am N-terminalen Ende eine abspaltbare Markierung aufweist.

50

HY3 codiert für eine kurze RNA, mit der das rekombinante SSA60-Protein assoziiert oder gebunden wird. Die Assoziierung von SSA60 mit HY3 induziert Konformationsepitope des Antigens, die zu einem unterschiedlichen immunologischen Verhalten im Vergleich zu einem SSA60-Protein führen, das keine HY3-RNA enthält. Die beiden Autoimmunantigene SSB und SSA60 binden an das gleiche RNA-Molekül, während SSA52 wahrscheinlich direkt mit dem SSA60-Protein assoziiert ist.

55

Bei dem hier verwendeten rekombinanten humanen SSA60-Protein handelt es sich um die Form b, die im Klon pQE30 HY3 SSA60 M56 translatiert wird. Sie codiert für insgesamt 553 Aminosäuren. Die ersten zwölf Aminosäuren am N-terminalen Ende des Proteins werden vom Expressionsvektor codiert. Diese abspaltbare Markierung enthält eine geladene Gruppe von Aminosäuren, welche die Löslichkeit des Antigens erhöht und eine Gruppe von sechs His für die Affinitätsreinigung über Ni-NTA.

60

Der in Fig. 1 gezeigte Vergleich der Aminosäuresequenz der rekombinanten Antigene SSA60 M4-C6 und SSA60 M56 zeigt, daß das N-terminale Ende des rekombinanten SSA60-Antigens geändert wurde von MRGSHHHHHHGSMEES... (Sequenz eines bisher verwendeten Klons) zu MRGSHHHHHHGGDDDDKEES...

In der neuen Sequenz SSA60 M56 wurde eine DDDK-Sequenz nach dem Abschnitt mit 6 His-Aminosäuren eingeführt, welche eine Spaltsequenz für Protease Bovine Enterokinase ist. Dies ermöglicht die Eliminierung des MRGSHHHHHHGGDDDDK-Peptids nach Reinigung des Antigens über Ni-NTA. Das C-terminale Ende des rekombinanten Antigens wurde von ...IRNFTLDMIVD** verändert (bisher verwendeter Klon) zu ...IRNFTLDMI**. Die Sterne markieren repetitive Translationsstoppsignale am Ende des Proteins. Die Sequenz ...DMI stellt das C-terminale Ende des nativen und rekombinanten Antigens dar.

HY3 ist eine kleine RNA mit 101 Basen und hat eine definierte Sekundärstruktur. Die Bindung von SSA60 erfolgt an die Basis der festen Struktur. Im Vergleich zur im Stand der Technik veröffentlichten Struktur von HY3 (Wolin et al., PNAS USA 81 (1984), 1996–2000) weist die hier verwendete Sequenz einen Unterschied in der Schleife 2 der RNA auf (siehe Fig. 2).

Die DNA-Sequenz des rekombinanten SSA60-Proteins und des HY3-RNA-Gens ist in Fig. 3 gezeigt. Charakteristische Restriktionsstellen im Klon sind angezeigt. So ergibt eine Restriktionsspaltung der Plasmid-DNA des Klons pQE30 HY3 SSA60 M56, z. B. durch XhoI, BglIII und SacI, vier DNA-Fragmente mit 187 bp, 698 bp, 1.038 bp und den Vektor (= 3.400 bp).

Beispiel 2

Herstellung des Expressionsvektors

Es wurde der Expressionsvektor pQE30 verwendet, welcher ein kleines Plasmid mit 3.462 bp ist (erhältlich von Qiagen). Dieser Expressionsvektor wurde speziell für eine Expression von Proteinen in E.coli entworfen. Er enthält ein regulierbares Promotor/Operator-Element und eine starke Ribosombindestelle vor mehreren Klonierungsstellen (BamHI und HindIII neben anderen), die stromab einer Gruppe mit 6 His liegen. Die Expression des Gens unter Kontrolle des Promotor/Operator-Elements wird bei einer gegebenen Zelldichte durch Addition von IPTG induziert, welches den Repressor inaktiviert und den Promotor freisetzt.

Das rekombinante Plasmid pQE30 HY3 SSA60 M56, Klon 4, ergibt eine intrazelluläre Koexpression des rekombinanten humanen SSA60-Proteins und der HY3-RNA in E.coli. Zusammen bilden diese Komponenten einen Komplex mit Konformationsepitopen. Die Markierung mit 6 His erlaubt die Reinigung des Antigens durch eine Metallchelate-Affinitätschromatographie. Nicht denaturierende Reinigungsbedingungen sind erforderlich, um die Konformationsepitope des Komplexes zu erhalten.

Der lac-Repressor wird durch ein separates Plasmid codiert, das pREP4 genannt wird, welches mit dem Expressionsvektor pDS56 RBSII kompatibel ist. Das Plasmid pREP4 (von Qiagen) trägt einen Kanamycinresistenzfaktor, während der Expressionsvektor gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin resistent ist.

Die Auswahl des gewünschten Klons pQE30 HY3 SSA60 M56, Klon 4, mit pREP4 wird durch Züchten in Gegenwart der zwei Antibiotika Ampicillin und Kanamycin durchgeführt.

Zur Herstellung des Klons pQE30 HY3 SSA60 M56 wurde zunächst die HY3-RNA in vitro durch PCR (Polymerasekettenreaktion) unter Verwendung der Primer HY3F und HY3R synthetisiert. Die Sequenz der Primer war wie folgt:

Primer HY3-SynF:

5' ACTTGGTACCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGG
CTGGTCCGAGTGCAGTGGTGTTCACAACTAATTGATCACAACCA 3'

Primer HY3-SynR:

5' GTGTCTCGAGAAAGGCTAGTCAAGTGAAGCAGTGGGAGTG
GAGAAGGAACAAAGAAATCTGTAAGTGGTTGTGATCAATTAGTTG 3'

Fünf 100 µl PCR-Reaktionsgemische wurden hergestellt, die 10 µl 10× Taq-Puffer (Pharmacia), 8 µl dNTP (1 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3 µl von jedem der Primer HY3-SynF und HY3-SynR (jeweils 50 pmol/µl), 62 µl H₂O und 1 Tropfen Mineralöl (Sigma, M-3516) enthielten. Ein Heißstart wurde im ersten Zyklus bei 60°C mit 10 µl (5 Einheiten Pharmacia Taq und 2,5 Einheiten Pfu [Stratagene] in 1× Taq-Puffer) initiiert. Die DNA-Amplifikation wurde in einem Perkin Elmer Cycler 9600 unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:

1. Zyklus 1

- 30 Sekunden bei 98°C
- 2 Minuten bei 60°C
- 30 Sekunden bei 72°C

2. Zyklen 2 bis 6

- 30 Sekunden bei 95°C
- 20 Sekunden bei 65°C
- 30 Sekunden bei 72°C.

Die PCR-Fragmente wurden gesammelt, mit den Restriktionsenzymen XhoI und KpnI geschnitten, über Agarosegel gereinigt und in einen Bluescript II KS-Vektor kloniert, wobei das Gen HY3 für Transkriptionsstudien unter die Kontrolle des T7-Polymerasepromotors gestellt wurde. Dies ergab den Klon pBSII-HY3RNA3-1.

Die erwartete Sequenz des Gens HY3 wurde gefunden, mit Ausnahme einer Punktmutation, die in Fig. 2 dargestellt ist. In vitro transkribierte HY3-RNA wurde für die Renaturierung von SSA60-Antigen verwendet, was eine erhöhte po-

sitive immunologische Reaktivität des Antigens ergab.

Um die Synthese eines rekombinanten SSA60-Antigens ohne zusätzliche Aminosäuren im Vergleich zur nativen Sequenz zu ermöglichen, wurden vektorcodierte Aminosäuren im SSA60-Klon, der für die Koexpression von SSA60 und HY3 verwendet wurde, eliminiert. Das N-terminale Ende des rekombinanten SSA60-Antigens wurde dafür verändert auf MRGSHHHHHGDDDDKEES ... (Klon SSA60-M56). Das SSA60-Protein beginnt dabei mit den letzten drei Aminosäuren dieser Sequenz, nämlich EES..., während die restlichen Aminosäuren darstellen, die durch den Vektor codiert sind. Die Sequenzmodifikation wurde durch eine PCR-Reaktion eines 260-bp-Fragments erhalten, das die Basenpaare 506-758 der in Fig. 3 gezeigten SSA60-M56-Sequenz abdeckt. Die zwei Primer SSA60 M6-NF und SSA60 M6-NRev hatten die folgende Sequenz:

1. SSA60 M6-NF

5' cacagaattcattaaagaggagaaattaactatgagaggatcccatcacc
atcaccatcacggtgatgacgatgacaaagaggaatctg 3'

2. SSA60 M6-NRev

5' ctaattaaagcttcagcattttcaagg 3'

Die amplifizierte DNA von 260 bp wurde geschnitten und ersetzte das EcoRI/HindIII-Fragment des Klons SSA60-M4-C6. Die Sequenz des neuen Klons ist in Fig. 3 gezeigt.

Das C-terminale Ende des rekombinanten Antigens wurde von ...IRNFTLDMIVD** (Klon SSA60 M4-C6) in ...IRNFTLDMI** (Klon SSA60-M56) modifiziert. Die Sequenzmodifikation wurde durch eine PCR-Reaktion eines 260-bp-Fragments erhalten, das die bp 506-758 der in Fig. 3 gezeigten SSA60-M56-Sequenz umfaßt. Die zwei Primer SSA60M5-CF und SSA60M5-CRev hatten die folgende Sequenz:

1. SSA60M5-CF

5' gatactggagctctggatgtaattcgaaatttcacattagatatgattta
atagtcgagcgccagctt 3'

2. SSA60M5-CRev

5' aggcagctctagagcggcggtttgtcc 3'

Die amplifizierte DNA von 1.200 bp wurde mit den Restriktionsenzymen SacI und XbaI geschnitten und das geeignete Fragment in SSA60M4-C6 inseriert, was das zuvor vorliegende Fragment SacI-XbaI ersetzte (in Fig. 3 ist der Ort des Fragments stromab von SacI bei bp 2.155 gezeigt; XbaI ist nicht gezeigt, da es im Vektor pQE lokalisiert ist).

Der durch diese Veränderungen erhaltene Klon wurde pQE30-SSA60-M56 #6 genannt. Um SSA60 von M56SSA60M4-CI zu unterscheiden, wurde die Restriktionsstelle für Sall am Ende des SSA60-Antigens entfernt.

Es wurde ein Klon synthetisiert, der HY3 und SSA60 in E.coli koexprimiert und pQE30-HY3-SSA60M56 #4 genannt wurde. Für diese Zwecke wurde HY3 vor das SSA60-Gen in den Klon pQE30 SSA60 M56 #6 kloniert, wobei das Gen HY3 unter die Kontrolle der identischen Promotor- und Operatorsequenzen wie das SSA60-Gen gestellt wurde.

Das HY3-Gen wurde zur Insertion in die XhoI-Stelle von pQE30 durch Verändern seiner Sequenz, wie oben beschrieben, mit der Hilfe des Primers HYFPQE und HYRPQE durch PCR-Modifizierung vorbereitet. Die Sequenzen der zwei Primer waren:

HYFPQE

5' acttctcgagaaatcataaaaaatttattgtctttgtgagcggataacaattataataga
ttcaggctggtccgagtgagct 3'

HYRPQE

5' gtgtctcgagaaaatgccgccagcggaactggcggaaggctagtagtcaagt
gaagcagtgagg 3'

Das Produkt dieser Reaktion wurde mit dem Restriktionsenzym XhoI geschnitten und in die XhoI-Stelle des Klons pQE30 SSA60 M56 #6 kloniert, was den neuen Klon pQE30-HY3-SSA60M56 #4 ergab. Die DNA- und Proteinsequenz

des neuen Klons sind in Fig. 3 gezeigt.

Beispiel 3

Expression von pQE30-HY3-SSA60M56, Klon 4

Der für eine Überexpression des rekombinanten Ribonukleoprotein-Komplexes HY3-SSA60 verwendete E.coli-Stamm ist ein XL1 Blue (Stratagene) genanntes E.coli C-Derivat. Für die Überexpression des rekombinanten HY3-SSA60-Komplexes wird eine Kultur von pQE30-HY3-SSA60M56 #4 in XL1 mit pREP4 bei 28°C in einem selektiven TB-Medium (enthaltend Ampicillin und Kanamycin) gezüchtet. Bei etwa 25% der maximalen Zelldichte wird eine Transkription und Translation des rekombinanten Proteins mit 1 mM IPTG induziert und das Wachsen für 3 bis 5 Stunden bei 28°C fortgesetzt. Bakterienpellets, die das rekombinante Protein enthalten, werden durch Zentrifugation gesammelt und das Zellpellet bis zur Reinigung des überexprimierten rekombinanten Antigens gefroren gelagert.

Eine Optimierung der Expression von immunologisch reaktivem Material zeigte, daß insbesondere die Kombination von 1. einer Fermentation bei geringer Temperatur und 2. nicht denaturierende Reinigungsprotokolle zufriedenstellende Ergebnisse ergaben.

Zur Kontrolle der Überexpression des HY3-SSA60-Antigens wurden Proteinaliquots der induzierten Bakterien nach Elektrophorese auf einem SDS-Polyacrylamidgel angefärbt. Das rekombinante HY3-SSA60-Antigen wandert als Hauptproteinbande bei 75 kD, verglichen zu vorgefärbtem Seebblue-Marker (Novex # LC 5625).

Beispiel 4

Native Reinigung des koexprimierten HY3-RNA-SSA60-Konstrukts

Als Extraktionspuffer wurde ein Gemisch von 1 mM PMSF (hergestellt aus 0,2 M PMSF in 2-Propanol), Aprotinin (10 mg/ml in Wasser) in einer Menge von 10 µg/g Biomasse, Leupeptin (1 mg/ml in Wasser) in einer Menge von 15 µg/g Biomasse, Pepstatin (1 mg/ml in Methanol) in einer Menge von 15 µg/g Biomasse und Lysozym (10 mg/ml im Lysepuffer) in einer Menge von 100 µg/g Biomasse verwendet. Der Puffer wurde bei Raumtemperatur zugegeben, wobei ein Extraktionsverhältnis von 1 g Biomasse/5 ml Puffer umfassend 10 mM Tris, pH 7,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerin und 0,2% Tween 20 eingehalten wurde. Zur Extraktion wurde die Suspension in Eiswasser für 10 Minuten mit 5 Sekunden Intervallen ultraschallbehandelt. Die Abzentrifugierung erfolgte bei 4°C für 10 Minuten bei 10.000 g. Das gewünschte Ribonukleoprotein HY3-RNA-SSA60 liegt im Überstand in Lösung vor. Der Überstand wurde mit SDS-PAGE und Western Blot behandelt. Anschließend erfolgte eine Nickelreinigung der positiven Überstände unter nativen Laufbedingungen unter Verwendung eines Säulenlaufpuffers, der 10 mM TRIS, pH 7,0, 500 mM NaCl, 10% Glycerin und 0,2% Tween 20 umfaßte. Die Elution erfolgte mit 5 mM, 10 mM, 20 mM, 50 mM bzw. 100 mM Imidazol im Säulenlaufpuffer. Die Elutionsfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und die das gewünschte Ribonukleoprotein enthaltenden Fraktionen gesammelt.

Beispiel 5

Verwendung des HY3-RNA-SSA60-Ribonukleoproteins in einem diagnostischen Verfahren

Das für das SSA60-Vergleichsexperiment herangezogene Cobas Core Anti-SSA60 EIA Testformat ist in Fig. 5 gezeigt. Es ist vergleichbar mit dem Testformat für den Cobas Core HEp2 ANA EIA (Kombi-Test, vgl. Fig. 4), jedoch ist lediglich SSA60-Antigen zur Beschichtung verwendet worden.

1) Beschichtung

SSA60-Antigene wurden in Phosphatpuffer mit 0,15 M NaCl (PBS) und 2 mM EDTA bei Raumtemperatur (RT) für 14 bis 16 h mit gamma-bestrahlten Polystyrolkugeln (NUNC, Dänemark) bis zur Sättigung (max. SSA60-Bindungskapazität) inkubiert.

Nach 3maligem Waschen der Kugeln mit PBS wurden diese in 2% BSA/PBS-Lösung zur Abstättigung freier Bindungsstellen überführt (2–3 h bei Raumtemperatur (RT)). Die SSA60-Kugeln wurden danach für 2 h bei RT unter Vakuum getrocknet, in spezielle Trockenbehälter (Cobas Core) überführt und bis zum Gebrauch bei 4°C gelagert.

2) Testführung (EIA automatisch durch Cobas Core durchgeführt)

10 µl Serumprobe plus 250 µl Verdünnungsmittel plus SSA60-Kugel werden 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wird dreimal mit entionisiertem Wasser gewaschen mit 250 µl Maus-anti-Human-IgG-Peroxidase 15 min bei 37°C inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit entionisiertem Wasser und mit Peroxidasesubstrat TMB 15 min bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgt durch Messung der OD bei 650 nm. Das Farbsignal bei OD650 ist proportional zur spezifischen Antikörperkonzentration im Serum.

3) Seren

Die getesteten Seren sind zum Teil kommerzieller (Serum A: BM69660, Serum B: BM6020, Serum C: BM 7529, Serum D: BM69440, Serum E: M48/4713), zum Teil klinischer (Serum F: SS12) Herkunft. Bei letzterem handelt es sich um ein sehr selten vorkommendes Serum von einem Patienten mit Sjögren's Syndrom. Die Reaktivität von SSA60-Antikör-

DE 199 31 380 A 1

pern wurde mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Tests (ELISA) nachgewiesen. Die verwendeten kommerziellen Tests beinhalten dabei entweder natives oder rekombinantes SSA60 Antigen. Alle Positivseren waren mit dem beschichteten nativen SSA60-Antigen von Immunovision positiv detektierbar, während ein Teil dieser Proben mit dem beschichteten reinen SSA60-Protein aus E.coli (denaturiert) ein negatives Testresultat lieferten. Letztere Proben konvertierten durch den Einsatz von nativ gereinigtem hY3-RNA-SSA60 anstatt denaturiertem SSA60 von negativ zu positiv.

Damit wurde die gewünschte Reaktivität des hY3-RNA-SSA60-Antigens im Test bewiesen.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Versuch	In Sättigung beschichtetes SSA60-Antigen						
	OD650 nm	OD650nm	OD650nm	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff
Positivseren	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3	SSA60-hY3
Serum A	3,50	3,50	3,30	5,83	38,89	7,49	
1:10 verd.	0,98	3,50	1,41	1,63	38,89	3,20	
Serum B	2,55	3,50	3,50	4,24	38,89	7,85	
1:10 verd.	0,46	2,63	1,15	0,77	29,22	2,62	
Serum C	3,38	3,50	2,78	5,63	38,89	6,32	
Serum D	3,50	3,50	3,44	5,83	38,89	7,83	
1:10 verd.	0,44	3,50	1,67	0,73	38,89	3,80	
Serum E	0,50	3,50	3,46	0,84	38,89	7,87	
1:10 verd.	0,28	3,50	1,63	0,44	38,89	3,71	
Serum F	0,24	3,50	1,22	0,40	38,89	2,77	

Tabelle 1 Fortsetzung

Blutspenderseren	OD650 nm	OD650 nm	OD650 nm	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff
	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3
1	0.14	0.05	0.07	0.24	0.54	0.17
2	0.10	0.14	0.17	0.16	1.56	0.38
3	0.13	0.06	0.05	0.22	0.63	0.11
4	0.35	0.06	0.14	0.59	0.67	0.33
5	0.23	0.06	0.09	0.38	0.66	0.20
6	0.07	0.06	0.06	0.12	0.67	0.15
7	0.05	0.05	0.05	0.08	0.60	0.11
8	0.04	0.05	0.02	0.07	0.50	0.04
9	0.06	0.05	0.28	0.10	0.51	0.63
10	0.12	0.05	0.20	0.19	0.51	0.45
11	0.08	0.06	0.15	0.13	0.69	0.34
12	1.11	0.07	0.10	1.85	0.76	0.23
13	0.62	0.08	0.09	1.04	0.86	0.20
14	0.30	0.08	0.14	0.49	0.90	0.32
15	0.07	0.13	0.04	0.12	1.44	0.10
16	0.21	0.06	0.07	0.35	0.62	0.15
17	0.20	0.05	0.08	0.34	0.59	0.18

Blutspender	OD650 nm	OD650 nm	OD650 nm	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff	OD650/Cutoff
	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3	SSA60	Immunovision	SSA60-hY3
MW1	0.25	0.07	0.17			
STA1	0.27	0.03	0.21			
MWY1 + 1,5xSTA1	0.66	0.13	0.59			
MW2	0.17	0.06	0.13			
STA2	0.14	0.01	0.10			
Cutoff (> MW2 + 3xSTD2)	0.6	0.09	0.44			

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für Positivseren und Negativseren (Blutspenderseren), die unter Verwendung von rekombinant in E.coli ohne RNA hergestelltem SSA60, SSA60 von Immunovision (natives SSA60 aus Rindermilz) und erfindungsgemäß hergestelltem SSA60-hY3 erhalten werden. Wie hieraus zu ersehen ist, liegt die Sensitivität des erfindungsgemäß hergestellten SSA60-hY3 deutlich über der des SSA60 ohne RNA. Eine Probe wurde als negativ eingestuft,

DE 199 31 380 A 1

wenn $OD_{650\text{ nm/Cutoff}} < 1$ und als positiv eingestuft, wenn $OD_{650\text{ nm/Cutoff}} > 1$. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, werden die Positivseren B (1 : 10 verdünnt), D (1 : 10 verdünnt), E (unverdünnt und 1 : 10 verdünnt) sowie die klinische Probe Serum F, die mit SSA60 ohne RNA als negativ eingestuft werden, mit dem erfindungsgemäß hergestellten SSA60-hY3 richtigerweise als positiv erkannt.

- 5 Darüber hinaus weist das erfindungsgemäß hergestellte SSA60-hY3 auch eine höhere Spezifität als SSA60 ohne RNA oder SSA60 von Immunovision auf, wie dem zweiten Teil der Tabelle 1 entnommen werden kann. Dort sind die Ergebnisse von 17 Blutspendern (Negativseren) aufgeführt. Während hier mit SSA60 und auch mit SSA60 von Immunovision noch zwei Negativseren (Nr. 12 und 13, bzw. Nr. 2 und 15) als positiv eingestuft wurden, werden mit dem erfindungsgemäß hergestellten SSA60-hY3 alle Seren korrekt als Negativ erkannt.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

DE 199 31 380 A 1

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Roche Diagnostics GmbH 5

<120> Verfahren zur rekombinanten Herstellung von
Ribonukleoproteinen

<130> 20657PDE Ribonukleoproteine 10

<140> 19931380.6

<141> 1999-07-07 15

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1 20

<210> 1

<211> 552

<212> PRT 25

<213> Homo sapiens

<220>

<223> SSA60 M4-C6 30

<400> 1

Met Arg Gly Ser His His His His His Gly Ser Met Glu Glu Ser 35
1 5 10 15

Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile Ala Asn Ser Gln 40
20 25 30

Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg Leu His Arg Phe 45
35 40 45

Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile Lys Glu Gln Lys 50
50 55 60

Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu Ile Glu Asp Gly 55
65 70 75 80

Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe Ser Gln Glu Gly 60
85 90 95

Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu Ala Ile Cys Ser 65
100 105 110

Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe Lys Ala Val Ser 70
115 120 125

DE 199 31 380 A 1

Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe Ile Gln Phe Lys
 130 135 140
 5
 Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp Gly Arg Ala Leu
 145 150 155 160
 10
 Arg Lys Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly Gly Met Ala Leu
 165 170 175
 15
 Ala Leu Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp Ser His Lys
 180 185 190
 20
 Asp Leu Leu Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser Glu Gly Leu Ala
 195 200 205
 25
 Ile Val Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu Val His Glu Leu
 210 215 220
 30
 Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys Leu Leu Lys Tyr
 225 230 235 240
 35
 Leu Glu Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Lys Asp Glu Leu Glu Val
 245 250 255
 40
 Ile His Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu His Leu Leu Thr
 260 265 270
 45
 Asn His Leu Lys Ser Lys Glu Val Trp Lys Ala Leu Leu Gln Glu Met
 275 280 285
 50
 Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met Thr Ala Asn Ser
 290 295 300
 55
 Val Leu Glu Pro Gly Asn Ser Glu Val Ser Leu Val Cys Glu Lys Leu
 305 310 315 320
 60
 Cys Asn Glu Lys Leu Leu Lys Lys Ala Arg Ile His Pro Phe His Ile
 325 330 335
 65
 Leu Ile Ala Leu Glu Thr Tyr Lys Thr Gly His Gly Leu Arg Gly Lys
 340 345 350
 70
 Leu Lys Trp Arg Pro Asp Glu Glu Ile Leu Lys Ala Leu Asp Ala Ala
 355 360 365
 75
 Phe Tyr Lys Thr Phe Lys Thr Val Glu Pro Thr Gly Lys Arg Phe Leu
 370 375 380

DE 199 31 380 A 1

Leu Ala Val Asp Val Ser Ala Ser Met Asn Gln Arg Val Leu Gly Ser
385 390 395 400

5

Ile Leu Asn Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Met Cys Met Val Val Thr
405 410 415

Arg Thr Glu Lys Asp Ser Tyr Val Val Ala Phe Ser Asp Glu Met Val
420 425 430

10

Pro Cys Pro Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Gln Gln Val Leu Met Ala
435 440 445

15

Met Ser Gln Ile Pro Ala Gly Gly Thr Asp Cys Ser Leu Pro Met Ile
450 455 460

20

Trp Ala Gln Lys Thr Asn Thr Pro Ala Asp Val Phe Ile Val Phe Thr
465 470 475 480

25

Asp Asn Glu Thr Phe Ala Gly Gly Val His Pro Ala Ile Ala Leu Arg
485 490 495

30

Glu Tyr Arg Lys Lys Met Asp Ile Pro Ala Lys Leu Ile Val Cys Gly
500 505 510

Met Thr Ser Asn Gly Phe Thr Ile Ala Asp Pro Asp Asp Arg Gly Met
515 520 525

35

Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp Val Ile Arg Asn
530 535 540

40

Phe Thr Leu Asp Met Ile Val Asp
545 550

45

<210> 2

50

<211> 553

<212> PRT

<213> Homo sapiens

55

<220>

<223> SSA60 M56

60

<400> 2

Met Arg Gly Ser His His His His His His Gly Asp Asp Asp Asp Lys

1 5 10 15

65

DE 199 31 380 A 1

Glu Glu Ser Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile Ala
 20 25 30
 5 Asn Ser Gln Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg Leu
 35 40 45
 10 His Arg Phe Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile Lys
 50 55 60
 15 Glu Gln Lys Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu Ile
 65 70 75 80
 20 Glu Asp Gly Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe Ser
 85 90 95
 Gln Glu Gly Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu Ala
 100 105 110
 25 Ile Cys Ser Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe Lys
 115 120 125
 30 Ala Val Ser Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe Ile
 130 135 140
 35 Gln Phe Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp Gly
 145 150 155 160
 40 Arg Ala Leu Arg Lys Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly Gly
 165 170 175
 Met Ala Leu Ala Leu Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp
 180 185 190
 45 Ser His Lys Asp Leu Leu Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser Glu
 195 200 205
 50 Gly Leu Ala Ile Val Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu Val
 210 215 220
 55 His Glu Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys Leu
 225 230 235 240
 60 Leu Lys Tyr Leu Glu Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Lys Asp Glu
 245 250 255
 65 Leu Glu Val Ile His Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu His
 260 265 270

DE 199 31 380 A 1

Leu	Leu	Thr	Asn	His	Leu	Lys	Ser	Lys	Glu	Val	Trp	Lys	Ala	Leu	Leu				
				275					280							285			
Gln	Glu	Met	Pro	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Arg	Asn	Leu	Gly	Lys	Met	Thr				
				290					295							300			
Ala	Asn	Ser	Val	Leu	Glu	Pro	Gly	Asn	Ser	Glu	Val	Ser	Leu	Val	Cys				
				305					310					315			320		
Glu	Lys	Leu	Cys	Asn	Glu	Lys	Leu	Leu	Lys	Lys	Ala	Arg	Ile	His	Pro				
				325					330							335			
Phe	His	Ile	Leu	Ile	Ala	Leu	Glu	Thr	Tyr	Lys	Thr	Gly	His	Gly	Leu				
				340					345							350			
Arg	Gly	Lys	Leu	Lys	Trp	Arg	Pro	Asp	Glu	Glu	Ile	Leu	Lys	Ala	Leu				
				355					360							365			
Asp	Ala	Ala	Phe	Tyr	Lys	Thr	Phe	Lys	Thr	Val	Glu	Pro	Thr	Gly	Lys				
				370					375							380			
Arg	Phe	Leu	Leu	Ala	Val	Asp	Val	Ser	Ala	Ser	Met	Asn	Gln	Arg	Val				
				385					390					395			400		
Leu	Gly	Ser	Ile	Leu	Asn	Ala	Ser	Thr	Val	Ala	Ala	Ala	Met	Cys	Met				
				405					410							415			
Val	Val	Thr	Arg	Thr	Glu	Lys	Asp	Ser	Tyr	Val	Val	Ala	Phe	Ser	Asp				
				420					425							430			
Glu	Met	Val	Pro	Cys	Pro	Val	Thr	Thr	Asp	Met	Thr	Leu	Gln	Gln	Val				
				435					440							445			
Leu	Met	Ala	Met	Ser	Gln	Ile	Pro	Ala	Gly	Gly	Thr	Asp	Cys	Ser	Leu				
				450					455							460			
Pro	Met	Ile	Trp	Ala	Gln	Lys	Thr	Asn	Thr	Pro	Ala	Asp	Val	Phe	Ile				
				465					470							475			480
Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Glu	Thr	Phe	Ala	Gly	Gly	Val	His	Pro	Ala	Ile				
				485					490							495			
Ala	Leu	Arg	Glu	Tyr	Arg	Lys	Lys	Met	Asp	Ile	Pro	Ala	Lys	Leu	Ile				
				500					505							510			
Val	Cys	Gly	Met	Thr	Ser	Asn	Gly	Phe	Thr	Ile	Ala	Asp	Pro	Asp	Asp				
				515					520							525			

DE 199 31 380 A 1

Arg Gly Met Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp Val
530 535 540

5
Ile Arg Asn Phe Thr Leu Asp Met Ile
545 550

10

<210> 3

<211> 101

15

<212> DNA

<213> Homo sapiens

20

<220>

<223> HY3 (Wolin et al., PNAS 81 (1984); 1996-2000)

<400> 3

25

ggctgggtccg agtgcagtgg tgtttacaac taattgatca caaccagtta cagattttctt 60
tgttccttct ccaactccac tgcttcactt gactagcctt t 101

30

<210> 4

<211> 150

<212> DNA

35

<213> Homo sapiens

<220>

<223> HY3 aus: SSA60 M56

40

<400> 4

tttatttgct ttgtgagcgg ataacaatta taatagattc aggctgggtcc gagtgcagtg 60
gtgtttacaa ctaattgatc acaaccagtt acagatttct ttgttccttc ttcactccca 120
ctgcttcact tgactagcct ttgccgccag 150

50

<210> 5

<211> 2220

<212> DNA

<213> Homo sapiens

55

<220>

<221> CDS

<222> (533)..(2191)

60

<400> 5

gcgacacgga aatgttgaat actcatactc ttcctttttc aatattattg aagcatttat 60

65

cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttagaatga tttagaaaaa taaacaaata 120

DE 199 31 380 A 1

gggggtccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgacg tctaagaaac cattattatc	180	
atgacattaa cctataaaaa taggcgtatc acgaggccct ttcgtcttca cctcgagaaa	240	5
tcataaaaaa tttatttgct ttgtgagcgg ataacaatta taatagattc aggctgggtcc	300	
gagtgcagtg gtgtttacaa ctaattgatc acaaccagtt acagatttct ttgttccttc	360	10
ttcactccca ctgcttcact tgactagcct ttgccgccag ttccgctggc ggcattttct	420	
cgagaaatca taaaaaattt atttgctttg tgagcggata acaattataa tagattcaat	480	15
tgtgagcggg taacaatttc acacagaatt cattaaagag gagaaattaa cc atg gga	538	
	Met Gly	20
	1	
gga tcc cat cac cat cac cat cac ggt gat gac gat gac aaa gag gaa	586	
Gly Ser His His His His His His Gly Asp Asp Asp Asp Lys Glu Glu		25
5 10 15		
tct gta aac caa atg cag cca ctg aat gag aag cag ata gcc aat tct	634	
Ser Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile Ala Asn Ser		30
20 25 30		
cag gat gga tat gta tgg caa gtc act gac atg aat cga cta cac cgg	682	
Gln Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg Leu His Arg		35
35 40 45 50		
ttc tta tgt ttc ggt tct gaa ggt ggg act tat tat atc aaa gaa cag	730	
Phe Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile Lys Glu Gln		40
55 60 65		
aag ttg ggc ctt gaa aat gct gaa gct tta att aga ttg att gaa gat	778	
Lys Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu Ile Glu Asp		45
70 75 80		
ggc aga gga tgt gaa gtg ata caa gaa ata aag tca ttt agt caa gaa	826	
Gly Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe Ser Gln Glu		50
85 90 95		
ggc aga acc aca aag caa gag cct atg ctc ttt gca ctt gcc att tgt	874	
Gly Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu Ala Ile Cys		55
100 105 110		
tcc cag tgc tcc gat atc agc aca aaa caa gca gca ttc aag gct gtt	922	
Ser Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe Lys Ala Val		60
115 120 125 130		

DE 199 31 380 A 1

	tct gaa gtt tgt cgc att cct acc cat ctc ttt act ttt atc cag ttt	970
	Ser Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe Ile Gln Phe	
5	135 140 145	
	aag aaa gac ctg aag gaa agc atg aaa tgt ggc atg tgg ggt cgt gcc	1018
	Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp Gly Arg Ala	
10	150 155 160	
	ctc cgg aag gct ata gcg gac tgg tac aat gag aaa ggt ggc atg gcc	1066
	Leu Arg Lys Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly Gly Met Ala	
15	165 170 175	
	ctt gct ctg gca gtt aca aaa tat aaa cag aga aat ggc tgg tct cac	1114
	Leu Ala Leu Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp Ser His	
20	180 185 190	
	aaa gat cta tta aga ttg tca cat ctt aaa cct tcc agt gaa gga ctt	1162
	Lys Asp Leu Leu Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser Glu Gly Leu	
25	195 200 205 210	
	gca att gtg acc aaa tat att aca aag ggc tgg aaa gaa gtt cat gaa	1210
	Ala Ile Val Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu Val His Glu	
30	215 220 225	
	ttg tat aaa gaa aaa gca ctc tct gtg gag act gaa aaa tta tta aag	1258
	Leu Tyr Lys Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys Leu Leu Lys	
35	230 235 240	
	tat ctg gag gct gta gag aaa gtg aag cgc aca aaa gat gag cta gaa	1306
	Tyr Leu Glu Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Lys Asp Glu Leu Glu	
40	245 250 255	
	gtc att cat cta ata gaa gaa cat aga tta gtt aga gaa cat ctt tta	1354
	Val Ile His Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu His Leu Leu	
45	260 265 270	
	aca aat cac tta aag tct aaa gag gta tgg aag gct ttg tta caa gaa	1402
	Thr Asn His Leu Lys Ser Lys Glu Val Trp Lys Ala Leu Leu Gln Glu	
50	275 280 285 290	
	atg ccg ctt act gca tta cta agg aat cta gga aag atg act gct aat	1450
	Met Pro Leu Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met Thr Ala Asn	
55	295 300 305	
	tca gta ctt gaa cca gga aat tca gaa gta tct tta gta tgt gaa aaa	1498
	Ser Val Leu Glu Pro Gly Asn Ser Glu Val Ser Leu Val Cys Glu Lys	
60	310 315 320	

DE 199 31 380 A 1

ctg tgt aat gaa aaa cta tta aaa aag gct cgt ata cat cca ttt cat	1546	
Leu Cys Asn Glu Lys Leu Leu Lys Lys Ala Arg Ile His Pro Phe His		
325 330 335		5
att ttg atc gca tta gaa act tac aag aca ggt cat ggt ctc aga ggg	1594	
Ile Leu Ile Ala Leu Glu Thr Tyr Lys Thr Gly His Gly Leu Arg Gly		
340 345 350		10
aaa ctg aag tgg cgc cct gat gaa gaa att ttg aaa gca ttg gat gct	1642	
Lys Leu Lys Trp Arg Pro Asp Glu Glu Ile Leu Lys Ala Leu Asp Ala		
355 360 365 370		15
gct ttt tat aaa aca ttt aag aca gtt gaa cca act gga aaa cgt ttc	1690	
Ala Phe Tyr Lys Thr Phe Lys Thr Val Glu Pro Thr Gly Lys Arg Phe		
375 380 385		20
tta cta gct gtt gat gtc agt gct tct atg aac caa aga gtt ttg ggt	1738	
Leu Leu Ala Val Asp Val Ser Ala Ser Met Asn Gln Arg Val Leu Gly		
390 395 400		25
agt ata ctc aac gct agt aca gtt gct gca gca atg tgc atg gtt gtc	1786	
Ser Ile Leu Asn Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Met Cys Met Val Val		
405 410 415		30
aca cga aca gaa aaa gat tct tat gta gtt gct ttt tcc gat gaa atg	1834	
Thr Arg Thr Glu Lys Asp Ser Tyr Val Val Ala Phe Ser Asp Glu Met		
420 425 430		35
gta cca tgt cca gtg act aca gat atg acc tta caa cag gtt tta atg	1882	
Val Pro Cys Pro Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Gln Gln Val Leu Met		
435 440 445 450		40
gct atg agt cag atc cca gcg ggt gga act gat tgc tct ctt cca atg	1930	
Ala Met Ser Gln Ile Pro Ala Gly Gly Thr Asp Cys Ser Leu Pro Met		
455 460 465		45
atc tgg gct cag aag aca aac aca cct gct gat gtc ttc att gta ttc	1978	
Ile Trp Ala Gln Lys Thr Asn Thr Pro Ala Asp Val Phe Ile Val Phe		
470 475 480		50
act gat aat gag acc ttt gct gga ggt gtc cat cct gct att gct ctg	2026	
Thr Asp Asn Glu Thr Phe Ala Gly Gly Val His Pro Ala Ile Ala Leu		
485 490 495		55
agg gag tat cga aag aaa atg gat att cca gct aaa ttg att gtt tgt	2074	
Arg Glu Tyr Arg Lys Lys Met Asp Ile Pro Ala Lys Leu Ile Val Cys		
500 505 510		60
		65

DE 199 31 380 A 1

gga atg aca tca aat ggt ttc acc att gca gac cca gat gat aga ggc 2122
 Gly Met Thr Ser Asn Gly Phe Thr Ile Ala Asp Pro Asp Asp Arg Gly
 5 515 520 525 530

 atg ttg gat atg tgc ggc ttt gat act gga gct ctg gat gta att cga 2170
 Met Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp Val Ile Arg
 10 535 540 545

 aat ttc aca tta gat atg att taatagtcga gcttaattag ctgagcttg 2220
 Asn Phe Thr Leu Asp Met Ile
 15 550

 <210> 6
 <211> 553
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25

 <400> 6
 Met Gly Gly Ser His His His His His His Gly Asp Asp Asp Asp Lys
 30 1 5 10 15

 Glu Glu Ser Val Asn Gln Met Gln Pro Leu Asn Glu Lys Gln Ile Ala
 35 20 25 30

 Asn Ser Gln Asp Gly Tyr Val Trp Gln Val Thr Asp Met Asn Arg Leu
 40 35 40 45

 His Arg Phe Leu Cys Phe Gly Ser Glu Gly Gly Thr Tyr Tyr Ile Lys
 50 55 60

 Glu Gln Lys Leu Gly Leu Glu Asn Ala Glu Ala Leu Ile Arg Leu Ile
 45 65 70 75 80

 Glu Asp Gly Arg Gly Cys Glu Val Ile Gln Glu Ile Lys Ser Phe Ser
 50 85 90 95

 Gln Glu Gly Arg Thr Thr Lys Gln Glu Pro Met Leu Phe Ala Leu Ala
 55 100 105 110

 Ile Cys Ser Gln Cys Ser Asp Ile Ser Thr Lys Gln Ala Ala Phe Lys
 115 120 125

 Ala Val Ser Glu Val Cys Arg Ile Pro Thr His Leu Phe Thr Phe Ile
 60 130 135 140

 Gln Phe Lys Lys Asp Leu Lys Glu Ser Met Lys Cys Gly Met Trp Gly
 65

DE 199 31 380 A 1

145	150	155	160	
Arg Ala Leu Arg Lys	Ala Ile Ala Asp Trp Tyr Asn Glu Lys Gly Gly			5
	165	170	175	
Met Ala Leu Ala Leu	Ala Val Thr Lys Tyr Lys Gln Arg Asn Gly Trp			10
	180	185	190	
Ser His Lys Asp Leu Leu	Arg Leu Ser His Leu Lys Pro Ser Ser Glu			15
	195	200	205	
Gly Leu Ala Ile Val	Thr Lys Tyr Ile Thr Lys Gly Trp Lys Glu Val			20
	210	215	220	
His Glu Leu Tyr Lys	Glu Lys Ala Leu Ser Val Glu Thr Glu Lys Leu			25
	225	230	235	240
Leu Lys Tyr Leu Glu	Ala Val Glu Lys Val Lys Arg Thr Lys Asp Glu			30
	245	250	255	
Leu Glu Val Ile His	Leu Ile Glu Glu His Arg Leu Val Arg Glu His			35
	260	265	270	
Leu Leu Thr Asn His	Leu Lys Ser Lys Glu Val Trp Lys Ala Leu Leu			40
	275	280	285	
Gln Glu Met Pro Leu	Thr Ala Leu Leu Arg Asn Leu Gly Lys Met Thr			45
	290	295	300	
Ala Asn Ser Val Leu	Glu Pro Gly Asn Ser Glu Val Ser Leu Val Cys			50
	305	310	315	320
Glu Lys Leu Cys Asn	Glu Lys Leu Leu Lys Lys Ala Arg Ile His Pro			55
	325	330	335	
Phe His Ile Leu Ile	Ala Leu Glu Thr Tyr Lys Thr Gly His Gly Leu			60
	340	345	350	
Arg Gly Lys Leu Lys	Trp Arg Pro Asp Glu Glu Ile Leu Lys Ala Leu			65
	355	360	365	
Asp Ala Ala Phe Tyr	Lys Thr Phe Lys Thr Val Glu Pro Thr Gly Lys			70
	370	375	380	
Arg Phe Leu Leu Ala	Val Asp Val Ser Ala Ser Met Asn Gln Arg Val			75
	385	390	395	400
Leu Gly Ser Ile Leu	Asn Ala Ser Thr Val Ala Ala Ala Met Cys Met			80

DE 199 31 380 A 1

405 410 415

5 Val Val Thr Arg Thr Glu Lys Asp Ser Tyr Val Val Ala Phe Ser Asp
420 425 430

10 Glu Met Val Pro Cys Pro Val Thr Thr Asp Met Thr Leu Gln Gln Val
435 440 445

15 Leu Met Ala Met Ser Gln Ile Pro Ala Gly Gly Thr Asp Cys Ser Leu
450 455 460

20 Pro Met Ile Trp Ala Gln Lys Thr Asn Thr Pro Ala Asp Val Phe Ile
465 470 475 480

25 Val Phe Thr Asp Asn Glu Thr Phe Ala Gly Gly Val His Pro Ala Ile
485 490 495

30 Ala Leu Arg Glu Tyr Arg Lys Lys Met Asp Ile Pro Ala Lys Leu Ile
500 505 510

35 Val Cys Gly Met Thr Ser Asn Gly Phe Thr Ile Ala Asp Pro Asp Asp
515 520 525

40 Arg Gly Met Leu Asp Met Cys Gly Phe Asp Thr Gly Ala Leu Asp Val
530 535 540

45 Ile Arg Asn Phe Thr Leu Asp Met Ile
545 550

50 <210> 7
<211> 84
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

55 <220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
HY3-SynF

60 <400> 7
acttggtacc gaaattaata cgactcacta tagggagagg ctggtccgag tgcagtggtg 60
tttacaacta attgatcaca acca 84

65 <210> 8
<211> 85
<212> DNA

DE 199 31 380 A 1

<213> Künstliche Sequenz

<220>

5

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
HY3-SynR

<400> 8

10

gtgtctcgag aaaggctagt caagtgaagc agtgggagtg gagaaggaac aaagaaatct 60
gtaactggtt gtgatcaatt agttg 85

15

<210> 9

<211> 89

<212> DNA

20

<213> Künstliche Sequenz

<220>

25

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
SSA60M6-NF

<400> 9

30

cacagaattc attaaagagg agaaattaac tatgagagga tcccatcacc atcaccatca 60
cggatgatgac gatgacaaag aggaatctg 89

35

<210> 10

<211> 27

<212> DNA

40

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
SSA60M6-NRev

45

<400> 10

ctaattaaag cttcagcatt ttcaagg

27

50

<210> 11

<211> 68

55

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

60

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
SSA60M5-CF

65

<400> 11

gatactggag ctctggatgt aattcgaaat ttcacattag atatgattta atagtcgcga 60
gccagctt 68

5

<210> 12

<211> 28

10 <212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

15

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer
SSA60M5-CRev

<400> 12

20

aggcagctct agagcggcgg atttgtcc 28

25

<210> 13

<211> 82

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

30

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer HYFPQE

35

<400> 13

acttctcgag aaatcataaa aaatttattt gctttgtgag cggataacaa ttataataga 60
ttcaggctgg tccgagtga gt 82

40

<210> 14

<211> 62

45

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

50

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer HYRPQE

<400> 14

55

gtgtctcgag aaaatgccgc cagcgggaact ggccgcaaag gctagtcaag tgaagcagtg 60
gg 62

60

Patentansprüche

1. Verfahren zur rekombinanten Herstellung eines Ribonukleoproteins umfassend die Schritte:

65

(a) Bereitstellen einer prokaryontischen Wirtszelle, die (i) mindestens eine für eine Ribonukleinsäurekomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA und (ii) mindestens eine für eine Proteinkomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA enthält,

(b) Expressieren der DNAs (i) und (ii) unter Bedingungen, bei denen ein Ribonukleoprotein gebildet wird und

(c) Gewinnen des Ribonukleoproteins.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Eukaryonten-Ribonukleoprotein oder ein De-

riert davon herstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß ein SSA60-Ribonukleoprotein exprimiert wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Ribonukleinsäurekomponente um eine HY-RNA handelt.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die HY-RNA ausgewählt wird aus HY1, HY3, HY4 oder/und HY5. 5
6. Nukleinsäurekonstrukt umfassend einen Abschnitt, der eine für eine Proteinkomponente codierende DNA enthält und einen Abschnitt, der eine für eine Ribonukleinsäurekomponente codierende DNA enthält.
7. Konstrukt nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß es einen für ein SSA60-Protein codierenden Abschnitt umfaßt. 10
8. Konstrukt nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß es einen für eine HY-RNA codierenden Abschnitt umfaßt.
9. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß es einen für SSA60 und einen für HY3 codierenden Abschnitt umfaßt.
10. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine gleichzeitige Induktion der Ribonukleinsäurekomponente und der Proteinkomponente ermöglicht. 15
11. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß die codierenden Bereiche jeweils operativ mit einem lac-Operator verknüpft sind.
12. Rekombinante prokaryontische Zelle, dadurch gekennzeichnet, daß sie (i) mindestens eine für eine Ribonukleinsäurekomponente eines Ribonukleoproteins codierende DNA und (ii) mindestens eine für eine Proteinkomponente des Ribonukleoproteins codierende DNA enthält. 20
13. Rekombinantes Ribonukleoprotein erhältlich mit einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5.
14. Rekombinantes Ribonukleoprotein nach Anspruch 13 enthaltend eine Erkennungssequenz und/oder eine Spaltsequenz.
15. SSA60-Protein mit der in Fig. 1 gezeigten Sequenz SSA60M56 gegebenenfalls in Assoziation mit RNA. 25
16. Verwendung eines Ribonukleoproteins nach einem der Ansprüche 13 bis 15 für diagnostische Verfahren.
17. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes SSA60-Ribonukleoprotein für die Diagnostik von Autoimmunerkrankungen eingesetzt wird.
18. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe unter Verwendung eines Analyt-spezifischen Rezeptors, dadurch gekennzeichnet, daß man als Rezeptor ein Ribonukleoprotein nach Anspruch 13 einsetzt. 30
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Analyten um einen Antikörper gegen ein Ribonukleoprotein handelt.
20. Verfahren nach Anspruch 18 oder 19 zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend die Schritte
 - (a) Bereitstellen einer Festphase, die mit einem Ribonukleoprotein nach Anspruch 13 beschichtet ist,
 - (b) Inkontaktbringen der beschichteten Festphase mit einer Probe und 35
 - (c) Nachweis einer Bindung zwischen dem Analyten und der beschichteten Festphase.

Hierzu 8 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Fig. 1

obere Aminosäuresequenz:

SSA60 M4-C6

untere Aminosäuresequenz:

SSA60 M56

```
1 .....MRGSHHHHHHG...SMEESVNQMQLNEKQIANSQDGYVWQVTD
      |||||
      MRGSHHHHHHGDDDDKEESVNQMQLNEKQIANSQDGYVWQVTD

42 MNRLHRFLCFGSEGGTYIYIKEQKLGLENALIRLIEDGRGCEVIQBIKS
      |||||
      MNRLHRFLCFGSEGGTYIYIKEQKLGLENALIRLIEDGRGCEVIQBIKS

92 FSQEGRTTKQEPMLFALAICSQCSDISTKQAAFKA VSEVCRIPTHLFTFI
      |||||
      FSQEGRTTKQEPMLFALAICSQCSDISTKQAAFKA VSEVCRIPTHLFTFI

142 QFKKDLKESMKCGMWGRALRKAIADWYNEKGMALALAVTKYKQRNGWSH
      |||||
      QFKKDLKESMKCGMWGRALRKAIADWYNEKGMALALAVTKYKQRNGWSH

192 KDLLRLSHLKPSSSEGLAIVTKYITKGWKEVHELYKEKALSVETEKLLKYL
      |||||
      KDLLRLSHLKPSSSEGLAIVTKYITKGWKEVHELYKEKALSVETEKLLKYL

242 EAVEKVKRTKDELEVVIHLIEEHRLVREHLLTNHLKSKEVWKALLQEMPLT
      |||||
      EAVEKVKRTKDELEVVIHLIEEHRLVREHLLTNHLKSKEVWKALLQEMPLT

292 ALLRNLGKMTANSVLEPGNSEVSLVCEKLCNEKLLKKARIHPPHILIALE
      |||||
      ALLRNLGKMTANSVLEPGNSEVSLVCEKLCNEKLLKKARIHPPHILIALE

342 TYKTGHGLRGKLKWRPDEBILKALDAAFYKTFKTVEPTGKRFLLAVDVSA
      |||||
      TYKTGHGLRGKLKWRPDEBILKALDAAFYKTFKTVEPTGKRFLLAVDVSA

392 SMNQRLVLSILNASTVAAAMCMVTRTEKDSYVVAFSDEMVPVPTTDMT
      |||||
      SMNQRLVLSILNASTVAAAMCMVTRTEKDSYVVAFSDEMVPVPTTDMT

442 LQQVLMAMSQIPAGGTDCSLPMIWAQKTNTPADVFIVFTDNETFAGGVHP
      |||||
      LQQVLMAMSQIPAGGTDCSLPMIWAQKTNTPADVFIVFTDNETFAGGVHP

492 AIALREYRKMDIPAKLIVCGMTSNGFTIADPDDRGM LDMCGFDTGALDV
      |||||
      AIALREYRKMDIPAKLIVCGMTSNGFTIADPDDRGM LDMCGFDTGALDV

542 IRNFTLDMIVD**
      |||||
      IRNFTLDMI**
```

Fig. 2

obere Nucleinsäuresequenz: HY3 (Wolin et al.)
untere Nucleinsäuresequenz: HY3 aus HY3-SSA60M56

```
1 .....GGCTGGTCC 9
                                     |||||
251 TTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAGGCTGGTCC 300

10 GAGTGCAGTGGTGTGTTTACAATAATTGATCACAACCAGTTACAGATTTCT 59
   |||||
301 GAGTGCAGTGGTGTGTTTACAATAATTGATCACAACCAGTTACAGATTTCT 350

60 TTGTTCCCTTCTTCACTCCCACTGCTTCACCTGACTAGCCTTT..... 101
   |||||
351 TTGTTCCCTTCTTCACTCCCACTGCTTCACCTGACTAGCCTTTGCGGCCAG 400
```

Fig. 3

DNA- und Aminosäuresequenz von pEQ30-HY3-SSA60M56#4

1 GCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTCAATATTATTGAAGCATTAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CGCTGTGCCTTTACAACTTATGAGTATGAGAGGAAAAAGTTATAATACTTCGTAATA

61 CAGGGTATATGCTCATGACCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACRAATA
-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GTCCCAATAACAGAGTACTCGCCTATGTATAAACTTACATAAATCTTTTATTGTTTAT

121 GGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATATTATC
-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CCCCAAGGCGCGTGTAAAGGGGCTTTTACGGTGGACTGCAGATTCTTTGGTAATAATAG

181 ATGACATTAACTATATAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTTCGTCTTCACCTCGAGAA
-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TACTGTAAATGGATATTTTATCCGCATAGTGCTCCGGGAAAGCAGAAGTGGAGCTCTTT

241 TCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAGGCTGGTCC
-----+-----+-----+-----+-----+ 300
AGTATTTTTTAAATAAACGAACACTCGCCTATTGTTAATATTATCTAAGTCCGACCAGG

301 GAGTGCAGTGGTGTTTACAATAATTGATCACACCAGTTACAGATTTCTTTGTTCCTTC
-----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTCACGTCAACCAAAATGTTGATTAAGTGTGTTGTCATGTCTAAGAAACAAGGAAG

361 TTCCTCCCACTGCTTCACTTGACTAGCCTTTGCCGCCAGTTCCGCTGGCGGCATTTTCT
-----+-----+-----+-----+-----+ 420
AAGTGAGGGTGACGAAGTGAAGTATCGGAAACGGCGGTCAAGGCGACCGCCGTAAAGA

421 CGAGAAATCATAAAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCGGATAACAATTATAATAGATTCAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 480
GCTCTTAGTATTTTTTAAATAAACGAACACTCGCCTATTGTTAATATTATCTAAGTTA

481 TGTGAGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGAGGAGAAATTAACCATGGGAGG
-----+-----+-----+-----+-----+ 540
ACACTGCGCTATTGTTAAAGTGTGCTTAAGTAATTTCTCCTTTAATTGGTACCTTCC

541 ATCCCATCACCATCACCATCACGGTGTGACGATGACAAAGAGGAATCTGTAAACCAAT
-----+-----+-----+-----+-----+ 600
TAGGGTAGTGGTAGTGGTAGTGCCACTACTGCTACTGTTTCTCCTTAGACATTGGTTTA

S H H H H H H G D D D D K E E S V N Q M -

Fig. 3 (fortgesetzt)

GCAGCCACTGAATGAGAAGCAGATAGCCAATTCTCAGGATGGATATGTATGGCAAGTCAC
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
CGTCGGTGACTTACTCTTCGTCTATCGGTTAAGAGTCCTACCTATACATACCGTTTCAGTG
Q P L N E K Q I A N S Q D G Y V W Q V T -
TGACATGAATCGACTACACCGGTTCTTATGTTTCGGTTCTGAAGGTGGGACTTATTATAT
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
ACTGTACTTAGCTGATGTGGCCAAAGAATACAAAGCCAGACTTCCACCTGAATAATATA
D M N R L E R F L C F G S E G G T Y Y I -
HindIII
|
CAAAGAACAGAAGTTGGGCCTTGAAAATGCTGAAGCTTTAATTAGATTGATTGAAGATGG
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
GTTTCTGTCTTCAACCCGGAACCTTTACGACTTCGAATTAATCTAATACTTCTTACC
K E Q K L G L E N A E A L I R L I E D G -
CAGAGGATGTGAAGTGATACAAGAAATAAAGTCATTTAGTCAAGAAGGCAGAACCACAAA
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
GTCTCCTACACTTCACTATGTTCTTTATTTTCAAGTAAATCAGTTCTTCCGTCTTGGTGT
R G C E V I Q E I X S F S Q E G R T T K -
GCAAGAGCCTATGCTCTTTGCACTTGCCATTGTTCCAGTGTCTCCGATATCAGCACAAA
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
CGTTCTCGGATACGAGAAACGTGAACGGTAAACAAGGGTCACGAGGCTATAGTCTGTGTTT
Q E P M L F A L A I C S Q C S D I S T K -
ACAAGCAGCATTCAAGGCTGTTTCTGAAGTTTGTGCGATTCTTACCCATCTCTTTACTTT
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 960
TGTTCTGTCGTAGTTCCGACAAAGACTTCAAACAGCGTAAGGATGGGTAGAGAAATGAAA
Q A A F K A V S E V C R I P T H L F T F -
TATCCAGTTTAAAGAAAGACCTGAAGGAAAGCATGAAATGTGGCATGTGGGGTCGTGCCCT
961 -----+-----+-----+-----+-----+
ATAGGTCAAATTCTTTCTGGACTTCCTTTCTGTAATTTACACCGTACACCCAGCACGGGA
I Q F K K D L K E S M K C G M W G R A L -
CCGGAAGGCTATAGCGGACTGGTACAATGAGAAAGGTGGCATGGCCCTTGCTCTGGCAGT
1021 -----+-----+-----+-----+-----+
GGCCTTCCGATATCGCCTGACCATGTTACTCTTTCCACCGTACCGGAACGAGACCGTCA
R K A I A D W Y N E K G G M A L A L A V -
BglII
|
TACAAAATATAAACAGAGAAATGGCTGGTCTCACAAAGATCTATTAAAGATTGTACATCT
1081 -----+-----+-----+-----+-----+
ATGTTTTATATTGTCTCTTTACCGACCAGAGTGTCTTAGATAATTCTAACAGTGTAGA
T K Y K Q R N G W S H K D L L R L S H L -

Fig. 3 (fortgesetzt)

1141 TAAACCTTCCAGTGAAGGACTTGCAATTGTGACCAAATATATTACAAAGGGCTGCAAAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
ATTTGGAAGGTCACCTTCCTGAACGTTAACTGCTTATATAATGTTTCCCGACCTTTCT
K P S S E G L A I V T K Y I T K G W K E -

1201 AGTTCATGAATTGTATAAGAAAAAGCACTCTCTGTGGAGACTGAAAAATTATTAAAGTA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCAAGTACTTAACATATTTCTTTTTCGTGAGAGACACCTCTGACTTTTAAATAATTTCTAT
V H E L Y K E K A L S V E T E K L L K Y -

1261 TCTGGAGGCTGTAGAGAAAGTGAAGCGCACAAAAGATGAGCTAGAAGTCATTCTATCTAAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
AGACCTCCGACATCTCTTTCACTTCGCGTGTCTTCTACTCGATCTTCAGTAAGTAGATTA
L E A V E K V K R T K D E L E V I H L I -

1321 AGAAGAACATAGATTAGTTAGAGAACATCTTTTAAACAATCACTTAAAGTCTAAAGAGGT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTCTGTATCTAATCAATCTCTGTAGAAAATTGTTTAGTGAATTTTCAGATTTCTCCA
E E H R L V R E E L L T N H L K S K E V -

1381 ATGGAAGGCTTTGTTACAAGAAATGCCGCTTACTGCATTACTAAGGAATCTAGGAAAGAT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TACCTTCCGAAACAATGTTCTTTACGGCGAATGACGTAATGATTCCTTAGATCCTTTCTA
W K A L L Q E M P L T A L L R N L G K M -

1441 GACTGCTAATTCAGTACTTGAACCGGAAATTCAGAAGTATCTTTAGTATGTGAAAAACT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CTGACGATTAAGTCATGAACCTTGGTCTTTAAGTCTTCATAGAAATCATACACTTTTGA
T A N S V L E P G N S E V S L V C E K L -

1501 GTGTAATGAAAACTATTAAAAAGGCTCGTATACATCCATTTTCATATTGATCGCATT
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
CACATTACTTTTGAATAATTTTCCGAGCATATGTAGGTAAAGTATAAACTAGCGTAA
C N E K L L K K A R I H P F H I L I A L -

NarI
|

1561 AGAAACTTACAAGACAGGTCATGGTCTCAGAGGGAAACTGAAGTGGCGCCCTGATGAAGA
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TCTTTGAATGTTCTGTCCAGTACCAGAGTCTCCCTTTGACTTCACCGCGGACTACTTCT
E T Y K T G H G L R G K L K W R P D E E -

1621 AATTTTGAAAGCATTTGGATGCTGCTTTTATAAAACATTTAAGACAGTTGAACCAACTGG
-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+
TTAAACTTTTCGTAACCTACGACGAAAAATATTTGTAAATCTGTCAACTTGGTTGACC
I L K A L D A A F Y K T F K T V E P T G -

Fig. 3 (fortgesetzt)

1681 AAAACGTTTCTTACTAGCTGTTGATGTCAGTGCCTTCTATGAACCAAAGAGTTTGGGTAG
-----+-----+-----+-----+-----+
TTTTCGCAAGAATGATCGACAACTACAGTCACGAAGATACTTGGTTTCTCAAACCCATC
K R F L L A V D V S A S M N Q R V L G S -
PstI
|
1741 TATACTCAACGCTAGTACAGTTGCTGCAGCAATGTGCATGGTTGTCACACGAACAGAAAA
-----+-----+-----+-----+-----+
ATATGAGTTGCGATCATGTCAACGACGTCGTTACACGTACCAACAGTGTGCTTGTCTTTT
I L N A S T V A A A M C M V V T R T E K -
KpnI
|
1801 AGATTCTTATGTAGTTGCTTTTTCGATGAAATGGTACCATGTCCAGTGACTACAGATAT
-----+-----+-----+-----+-----+
TCTAAGATACATCAACGAAAAGGCTACCTTACCATGGTACAGGTCACGTGATGTCTATA
D S Y V V A F S D E M V P C P V T T D M -
1861 GACCTTACAACAGGTTTAAATGGCTATGAGTCAGATCCCAGCGGGTGGAACTGATTGCTC
-----+-----+-----+-----+-----+
CTGGAATGTTGTCCAAAATTACCGATACTCAGTCTAGGGTCGCCACCTTGACTAACGAG
T L Q Q V L M A M S Q I P A G G T D C S -
1921 TCTTCCAATGATCTGGGCTCAGAAGACAAACACACCTGCTGATGTCTTCATTGTATTAC
-----+-----+-----+-----+-----+
AGAAGGTTACTAGACCCGAGTCTTCTGTTGTGTGGACGACTACAGAAGTAACATAAGTG
L P M I W A Q K T N T P A D V F I V F T -
1981 TGATAATGAGACCTTTGCTGGAGGTGTCCATCCTGCTATTGCTCTGAGGGAGTATCGAAA
-----+-----+-----+-----+-----+
ACTATTACTCTGGAACGACCTCCACAGGTAGGACGATAACGAGACTCCCTCATAGCTTT
D N E T F A G G V H P A I A L R E Y R K -
2041 GAAAATCGATATTCCAGCTAAATTGATTGTTTGTGGAATGACATCAAATGGTTTCACCAT
-----+-----+-----+-----+-----+
CTTTTACCTATAAGGTGCGATTAACTAACAAACACCTTACTGTAGTTTACCAAAGTGGTA
K M D I P A K L I V C G M T S N G F T I -
SacI
|
2101 TGCAGACCCAGATGATAGAGGCATGTTGGATATGTGCGGCTTTGATACTGGAGCTCTGGA
-----+-----+-----+-----+-----+
ACGTCTGGGTCTACTATCTCCGTACAACCTATACACGCCGAAACTATGACCTCGAGACCT
A D P D D R G M L D M C G F D T G A L D -
2161 TGTAATTGAAAATTCACATTAGATATGATTTAATAGTCGAGCTTAATTAGCTGAGCTTG
-----+-----+-----+-----+-----+
ACATTAAGCTTTAAAGTGTAATCTATACTAAATTATCAGCTCGAATTAATCGACTCGAAC
V I R N F T L D M I * *

Fig. 4

Testformat COBAS CORE HEp2 ANA EIA

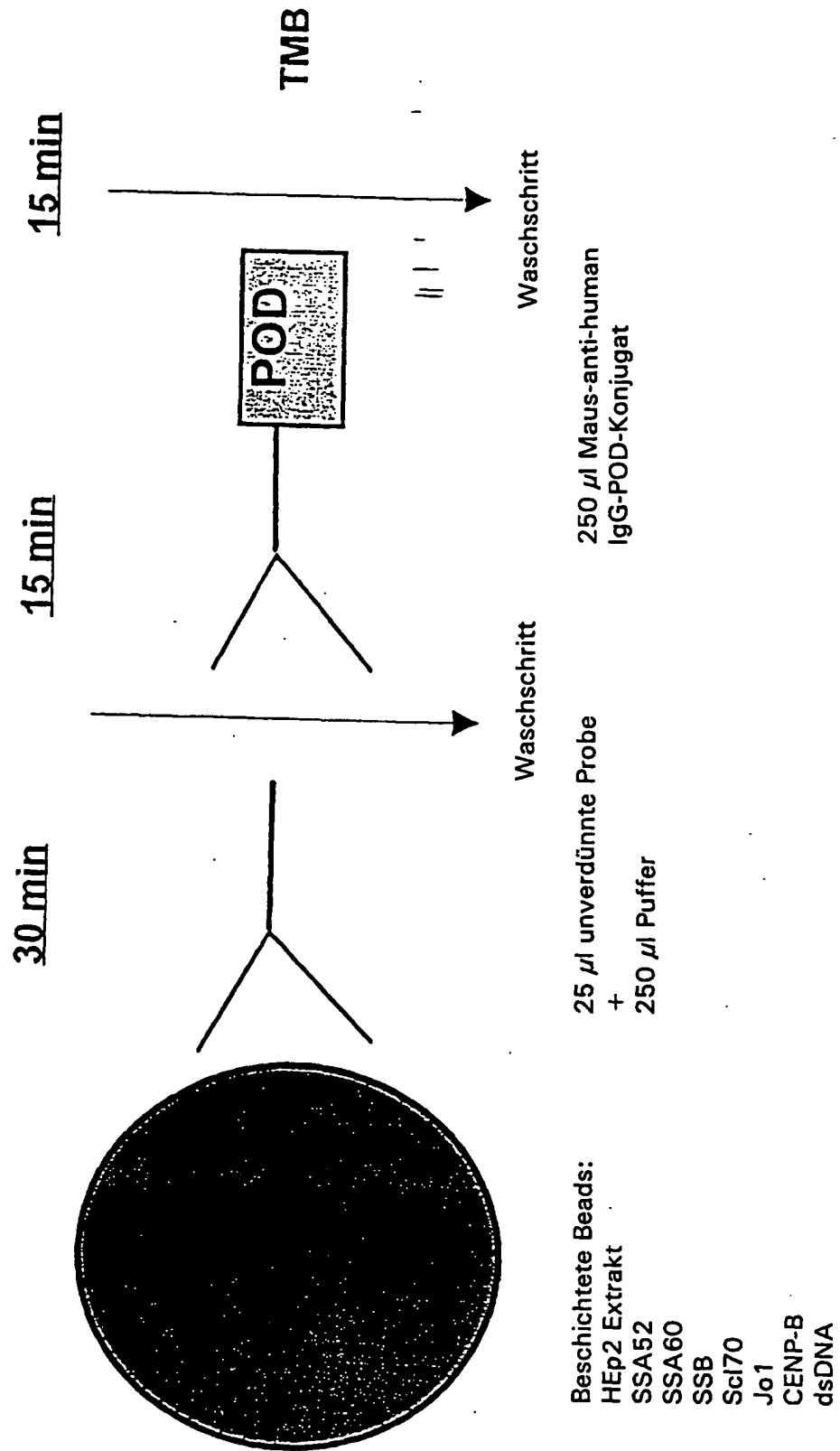


Fig. 5

Testformat COBAS CORE ANTI-SSA60 EIA

